

STANOVENÍ POLYBROMOVANÝCH DIFENYLETHERŮ METODOU GC-MS/MS

ROMAN GRABIC^a, ŠÁRKA CRHOVÁ^a,
MARTINA ŠEBESTOVÁ^a a VĚRA PACÁKOVÁ^b

^aOkresní hygienická stanice Frýdek-Místek, Národní referenční laboratoř pro perzistentní organické polutanty, Palackého 121, 738 02 Frýdek-Místek, ^bKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
e-mail: Grabic@ohsfm.cz, pacakova@natur.cuni.cz

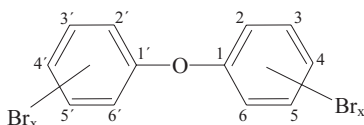
Došlo dne 22.XI.2001

Klíčová slova: polybromované difenylethery, GC-MS/MS, biotické vzorky

Úvod

Polybromované difenylethery (PBDE) jsou průmyslově vyráběné retardéry hoření. Přidávají se do plastů, textilií, dielektrik apod. Jejich obsah v plastech může činit až 30 %. V roce 1992 byla roční produkce PBDE 40 000 tun a od té doby stále roste^{1,2}. PBDE nejsou v plastech kovalentně vázány a jsou postupně uvolňovány do okolního prostředí. Jak vyplývá z jejich struktury (obr. 1), jsou to látky málo těkavé s velkou molekulovou hmotností, tudíž jde o perzistentní polutanty, které jsou silně hydrofobní a dobře rozpustné v tucích. Nalézají se hlavně v rybách (cca ng.g⁻¹ tuku), v lidských tukových tkáních (0,5–1 ng.g⁻¹ tuku) a v mateřském mléce. Mají podobné účinky na organismus jako polychlorované bifenyly (PCB). Bylo prokázáno, že způsobují poruchy štítné žlázy. Vzhledem ke stále většímu využívání plastů a nedořešené recyklaci a likvidaci jejich odpadů se PBDE mohou stát významným zdrojem kontaminace životního prostředí, neboť na rozdíl od perzistentních chlorovaných látek, jako jsou polychlorované bifenyly (PCB), polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany (PCDD/F) apod., jejichž koncentrace ve složkách životního prostředí i v mateřském mléce klesá, obsah PBDE exponenciálně roste^{3–5}. Proto je stanovení těchto látek aktuální i v České republice.

Komerčně jsou vyráběny tři směsi, které obsahují hlavně deka- (75 % produkce), okta- (15 %) nebo penta-BDE (10 %). Nižší deriváty (penta-BDE) jsou silněji toxické než deka-BDE (cit.⁶). V komerčních produktech, např. v Bromkalu 70-5DE, se vyskytuje podstatně méně kongenerů než ve srovnatelných komerčních směsích PCB. Hlavními složkami Bromkalu 70-5DE jsou tri- až hexabromované kongenery (pro zjednodušení byla zavedena stejná nomenklatura jako u PCB). Stejně jako se používá pro zjednodušení analýz PCB pouze



Obr. 1. Obecný vzorec polybromovaných difenyletherů

stanovení indikátorových kongenerů, tak v případě PBDE jsou většinou analyzovány pouze následující kongenery: PBDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183.

Vzhledem k velmi nízkým koncentračním hladinám PBDE je nejčastěji užívanou metodou plynová chromatografie v kombinaci s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (GC-HRMS) (cit.^{3,4,7–9}). Perspektivní instrumentální technikou dostupnou i v ČR se jeví na základě našich zkušeností GC-MS/MS s použitím metody isotopového ředění nebo vnitřního standardu¹⁰.

Experimentální část

Reagencie

Standardní směsi nativních a isotopicky značených PBDE byly získány od firmy Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Kanada). Všechny ostatní chemikálie byly od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Vzorky lidského podkožního tuku byly získány od SZÚ Praha v rámci programu „Systém monitorování zdravotního stavu populace ve vztahu k životnímu prostředí“¹¹. Vzorky pro validaci metody byly uměle připraveny z komerčního vepřového sádla.

Aparatura

Byly použity přístroje GC/MS – PolarisQ a GCQ, Thermoquest (Finnigan MAT, San Jose, USA). Pracovní podmínky byly optimalizovány postupem popsáním v práci¹⁰.

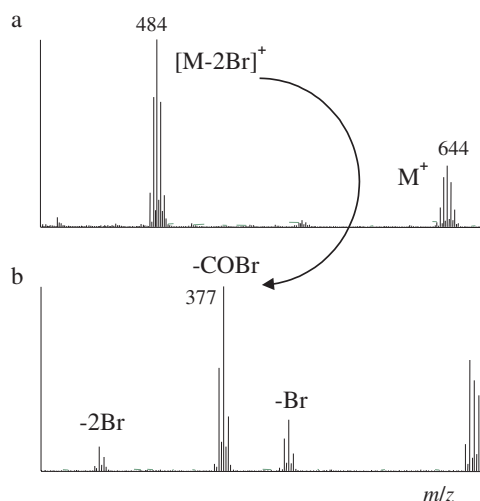
K separaci byly použity kapilární kolony DB-5ms (30 nebo 60 m × 0,25 mm × 0,25 μm) od firmy J & W Scientific, Folsom, USA). Nástřík vzorku byl technikou „splitless“, a to 2 μl vzorku v nonanu. Byl použit následující teplotní program: 1 min isotermálně při 150 °C, potom program 20 °C.min⁻¹ do 180 °C, dále 2,5 °C.min⁻¹ do 300 °C a 2 min isotermálně.

Pracovní postup

Extrakce a čištění vzorků i přečištění extraktů použité v této práci jsou analogické stanovením PCB nebo PCDD/F (cit.¹⁰). Při vyšších koncentracích PBDE (od 0,1 ng.g⁻¹ tuku) je možné použít pro odstranění tuků a ostatních koextraktů pouze chromatografii na sloupci silikagelu impregnovaného kyselinou sírovou (navážka tuku kolem 0,4 g). V případě nižších koncentrací je výhodné použít dialýzu na polyethylenových membránách (SPM) s následným dočištěním¹⁰. Chování PBDE při tomto čisticím postupu je shodné s PCDD/F.

Výsledky a diskuse

Pro látky typu PCB, PBDE (na rozdíl od PCDD/F a polychlorovaných naftalenů (PCN)) neplatí princip stejné molární odezvy (tzn. různé isomery PBDE mají rozdílné odezvy na hmotnostním detektoru). V případě PBDE je tato skutečnost komplikována tím, že ve spektru jsou nejvíce zastoupeny ionty odpovídající isotopovému klastru fragmentu [M–2Br]⁺. Na obr. 2 je uvedeno jak spektrum v plném skenu, tak i spektrum MS/MS. Z tohoto obrázku je patrné, že nejvýraznější zastoupeným iontem ve spektru MS/MS je fragment odpovídající



Obr. 2. Spektra HxBDE v plném skenu (a) a MS/MS spektrum (b)

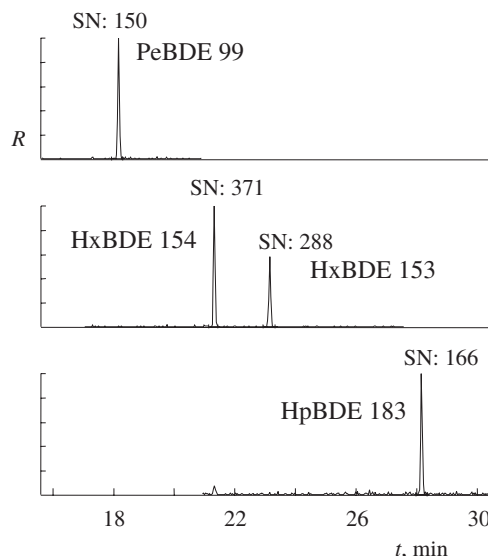
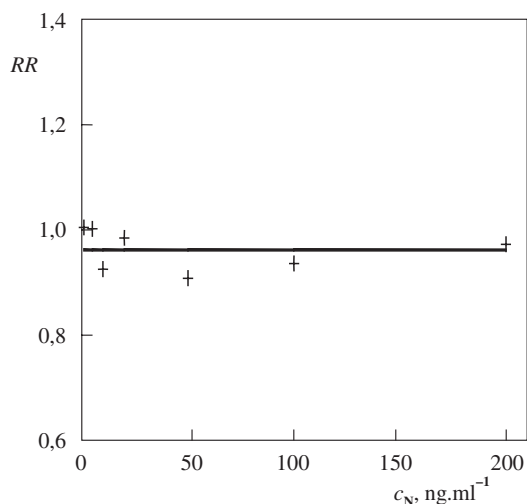
ztrátě COBr. Toto chování je charakteristické jak pro chlorované, tak i pro bromované difenylethery.

Stanovení PBDE na m/z odpovídajícímu dceřinému iontu $[M-2Br]^+-COBr$ nám poskytuje dostatečnou selektivitu i citlivost pro dosažení nízkých koncentračních hladin (0,2–0,5 pg v nástřiku).

Obr. 3 ukazuje chromatogram kalibračního standardu penta- až heptaBDE o koncentraci 2 pg v nástřiku. Za podmínek uvedených v experimentální části byla ověřena linearita odezvy, vyjádřené jako poměr plochy nativní látky k ploše isotopicky značeného vnitřního standardu, pro všech sedm kongenerů v rozsahu koncentrací od 1 do 200 $ng \cdot ml^{-1}$ při konstantní koncentraci vnitřních standardů 20 $ng \cdot ml^{-1}$. Pro všechny body kalibrace byly také vypočteny relativní faktory odezvy.

$$RR = \frac{A_N \cdot c_{IZ}}{A_{IZ} \cdot c_N} \quad (1)$$

kde je RR relativní faktor odezvy, A_N plocha píku nativního analytu, A_{IZ} plocha píku isotopicky značeného standardu v $ng \cdot ml^{-1}$, c_N koncentrace nativního analytu a c_{IZ} koncentrace isotopicky značeného standardu v $ng \cdot ml^{-1}$.

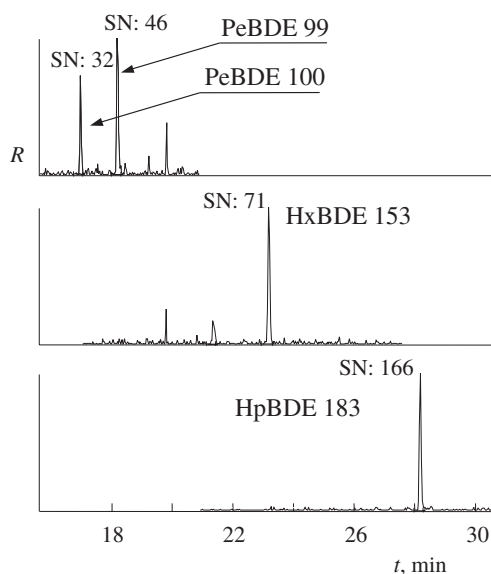
Obr. 3. Chromatogram kalibračního standardu pentaBDE až heptaBDE 1 $ng \cdot ml^{-1}$, R – relativní odezvaObr. 4. Závislost hodnot relativního faktoru odezvy (RR) na koncentraci nativního analytu (c_N) pro PBDE 99

Tabulka I

Parametry kalibračních závislostí pro stanovení PBDE

Kongener PBDE	Rovnice kalibrační přímky	Koeficient determinace R^2	Průměrný odezvový faktor	SD ^a	RSD ^b [%]
28	$y = 0,0317x - 0,0051^c$	0,9998	0,612	0,026	3,9
47	$y = 0,0475x + 0,0097$	0,9999	0,963	0,027	2,6
99	$y = 0,0484x - 0,0371$	0,9994	0,962	0,039	3,7
154	$y = 0,0785x + 0,0966$	0,9996	1,637	0,077	4,3
153	$y = 0,0536x + 0,0033$	1,0000	1,074	0,018	1,6
183	$y = 0,0379x - 0,0941$	0,9992	0,654	0,069	9,8

^a Směrodatná odchylka, ^b relativní směrodatná odchylka, ^c x je koncentrace ($ng \cdot ml^{-1}$) a y je relativní odezva



Obr. 5. Chromatogram pentaBDE až heptaBDE ve vzorku lidského podkožního tuku. *R* – relativní odezva

Rovnice regresních přímek spolu s koeficienty determinace R^2 , průměrnými relativními faktory odezvy a jejich směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v tabulce I. Z této tabulky vyplývá, že odezva v daném koncentračním rozmezí je pro všechny testované kongenery lineární. Na obr. 4 je znázorněna závislost relativních faktorů odezvy na koncentraci nativního standardu pro PBDE 99. Je patrné, že tento faktor je konstantní pro uvedený rozsah koncentrací a hodnoty jsou náhodně rozloženy kolem průměrné hodnoty.

Dále byly zjišťovány detekční limity a výtěžnost metody pro dvě úrovně koncentrace a dvě metody úpravy vzorku. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách II a III spolu s relativními směrodatnými odchylkami. Výtěžnost obou postupů je velmi dobrá (84 až 105 %) při opakovatelnosti, která se pohybuje kolem 3 % pro vyšší koncentrační hladinu a mezi 4 až 10 % pro nižší koncentrační hladinu v kombinaci s SPM.

Metoda byla aplikována na stanovení PBDE v lidském podkožním tuku. Na obr. 5 je zobrazen chromatografický záznam analýzy. V tabulce IV jsou uvedeny hodnoty nalezené pro 7 nejdůležitějších kongenerů. Zjištěné hodnoty koncentrací se pohybují mezi úrovněmi kontaminace PCB (řádově stovky $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku) a PCDD/F (řádově jednotky až desítky $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku).

Metoda MS/MS je vhodnou alternativou pro stanovení PBDE ve všech typech matric. Zcela zásadním předpokladem úspěšného stanovení je vhodně zvolený způsob přečištění vzorku. Metoda GC-MS/MS je poté velmi robustní, umožňuje mnohonásobné opakované analýzy vzorků bez ztráty citlivosti.

Závěr

Byla vyvinuta metoda pro stanovení PBDE a aplikována na biotické vzorky. Při použití metody isotopového zředění je dosaženo dobré opakovatelnosti i na nízkých koncentračních

Tabulka II

Výtěžnost, RSD a průměrný detekční limit vybraných kongenerů PBDE na koncentrační úrovni $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku (navážka vzorku 0,4 g tuku byla přečištěna na sloupci silikagelu impregnovaného kyselinou sírovou; finální objem vzorku byl $50 \mu\text{l}$)

Kongener PBDE	Výtěžnost [%]	RSD ^a [%]	Průměrný detekční limit [$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku]
28	84	4,0	0,05
47	101	3,0	0,04
99	104	3,0	0,05
154	92	3,0	0,05
153	93	2,0	0,06
183	85	13,0	0,08

^a Relativní směrodatná odchylka

Tabulka III

Výtěžnost, RSD a průměrný detekční limit vybraných kongenerů PBDE na koncentrační úrovni $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku (navážka vzorku 5 g tuku byla přečištěna dialýzou na SPM a poté celým postupem pro čištění PCDD/F (cit.¹⁰); finální objem vzorku byl $100 \mu\text{l}$)

Kongener PBDE	Výtěžnost [%]	RSD ^a [%]	Průměrný detekční limit [$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku]
28	108	3,6	0,006
47	98	4,3	0,004
99	102	6,9	0,006
154	85	6,0	0,006
153	90	8,1	0,012
183	95	9,1	0,026

^a Relativní směrodatná odchylka

Tabulka IV

Koncentrační rozsah kongenerů PBDE (*c*) stanovený v osmi vzorcích lidského podkožního tuku

Kongener PBDE	<i>c</i> [$\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ tuku]
28	0,03–0,13
47	0,23–1,5
99	0,08–0,47
100	0,09–2,4
154	0,012–0,11
153	0,10–1,9
183	0,05–0,83

hladinách. Pro čištění vzorků lze použít standardní postupy vyvinuté pro analýzu PCDD/F.

Děkujeme Systému monitorování zdravotního stavu populace ve vztahu k životnímu prostředí za poskytnutí vzorků.

LITERATURA

1. *Environmental Health Criteria 162: Brominated Diphenyl Ethers*, str. 31. WHO, Geneva 1994.
2. Stanley J. S., Cramer P. H., Thornburg K. R., Remmers J. C., Breen J. J., Schwemberger J.: *Chemosphere* 23, 1185 (1991).
3. Norén K., Meironyté D.: *Organohalogen. Comp.* 35, 1 (1998).
4. Meironyté D., Norén K., Bergman A.: *J. Toxicol. Environ. Health, A* 58, 329 (1999).
5. Paasivirta J.: *Toxicol. Environ. Chem.* 66, 59 (1998).
6. Hooper K., McDonald T. A.: *Environ. Health Perspect.* 108, 387 (2000).
7. Sjödin A., Jakobsson E., Kierkegaard A., Marsh G., Sellström V.: *J. Chromatogr., A* 822, 83 (1998).
8. Haglund P. S., Zook D. R., Buser H.-R., Hu J.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 3281 (1997).
9. Jansson B.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 340, 439 (1991).
10. Grabic R., Novák J., Pacáková V.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 23, 595 (2000).
11. Kliment V.: *Centr. Eur. J. Publ. Health* 5, 107 (1997).

R. Grabic^a, Š. Crhová^a, M. Šebestová^a, and V. Pacáková^b (^a*District Public Health Department, Frýdek-Místek*, ^b*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Determination of Polybrominated Diphenyl Ethers by GC-MS/MS**

A GC-MS/MS method for determination of the title compounds was developed, validated and applied to biotic samples. Standard purification procedures developed for analysis of polychlorinated dibenzodioxines or dibenzofurans were used. Using the isotope dilution method, a good repeatability was attained even at low concentrations.